

(C) WPI / DERWENT

AN - 1989-064999 [28]

AP - JP19870173549 19870710; JP19870173549 19870710; [Previous Publ.  
J01016799 ]

CPY - TOXN

DC - B04

FS - CPI

IC - A61K37/24 ; A61K38/22 ; C07K1/00 ; C07K3/00 ; C07K7/10 ; C07K14/635 ;  
C07K99/00

MC - B04-B02D3 B04-C01

M1 - [01] D011 D601 F014 F521 G010 G100 H1 H100 H101 H181 H182 H4 H401 H481  
H5 H598 H8 H9 J0 J011 J012 J1 J171 J172 J3 J371 K0 L2 L250 M210 M211  
M271 M280 M281 M311 M312 M313 M314 M315 M321 M332 M333 M340 M342 M343  
M349 M371 M381 M391 M423 M431 M510 M511 M520 M521 M530 M531 M540 M620  
M782 M903 P624 V624 V901 V902 V917 V921; 1704-X 1724-X 1711-X 1714-X  
M2 - [02] H4 H402 H482 H8 J0 J012 J1 J172 M280 M312 M321 M332 M344 M349  
M381 M391 M416 M431 M620 M782 M903 M904 M910 Q622; R00540-M; 1704-X  
1724-X 1711-X 1714-X

PA - (TOXN ) TOYO JOZO KK

PN - JP1016799 A 19890120 DW198909 004pp  
- JP2505812B2 B2 19960612 DW199628 C07K14/635 003pp

PR - JP19870173549 19870710

XA - C1989-028850

XIC - A61K-037/24 ; A61K-038/22 ; C07K-001/00 ; C07K-003/00 ; C07K-007/10 ;  
C07K-014/635 ; C07K-099/00AB - J01016799 Stabilised human parathyroid hormone peptide (1-34) (h-PTH  
(1-34)), is prep'd. from volatile organic acid salt of h-PTH (1-34) by  
removing the volatile organic acid as much as possible, next, by  
dissolving it into 1.8-25 wt.% of tartaric acid contg. aq. soln., then  
by lyophilising the obtd. soln. to prepare the stabilized h-PTH (1-34)  
compsn..- USE/ADVANTAGE - The compsn. is more thermostable than common h-PTH  
(1-34) acetate. When these are stored at 65 deg. C for 3 weeks, the  
residual activity (%) of this compsn. is 85.1, while that of the  
acetate is 72.6. (Dwg.0/O)

CN - R00540-M

DRL - 1704-X 1724-X 1711-X 1714-X

IW - STABILISED HUMAN PARATHYROID HORMONE PEPTIDE COMPOSITION PREPARATION  
CORRESPOND VOLATILE ORGANIC ACID DISSOLVE AQUEOUS TARTARIC ACID  
SOLUTION LYOPHILISEIKW - STABILISED HUMAN PARATHYROID HORMONE PEPTIDE COMPOSITION  
PREPARATIONCORRESPOND VOLATILE ORGANIC ACID DISSOLVE AQUEOUS TARTARIC ACID  
SOLUTION LYOPHILISE

NC - 001

OPD - 1987-07-10

ORD - 1989-01-20

PAW - (TOXN ) TOYO JOZO KK

TI - Stabilised human parathyroid hormone peptide compsn. - prep'd. from  
corresp. volatile organic acid dissolved in aq. tartaric acid soln.  
and lyophilised

## ⑪ 公開特許公報 (A)

昭64-16799

⑫ Int. Cl. 4

|           |       |
|-----------|-------|
| C 07 K    | 7/10  |
| A 61 K    | 37/24 |
| C 07 K    | 3/00  |
| // C 07 K | 99/00 |

識別記号

府内整理番号

⑬ 公開 昭和64年(1989)1月20日

|         |
|---------|
| 8318-4H |
| 8615-4C |
| 8318-4H |

審査請求 未請求 発明の数 2 (全4頁)

⑭ 発明の名称 h-PTH (1-34) 組成物およびその製造法

⑮ 特願 昭62-173549

⑯ 出願 昭62(1987)7月10日

⑰ 発明者 森田 香 静岡県田方郡修善寺町柏久保486-4

⑰ 発明者 野田 俊治 静岡県田方郡伊豆長岡町小坂908-5

⑰ 出願人 東洋醸造株式会社 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

## 明細書

## 1. 発明の名称

h-PTH (1-34) 組成物およびその  
製造法

## 2. 特許請求の範囲

1). ヒト副甲状腺ホルモンペプチド (1-34) 捕発性有機酸塩から存在していた捕発性有機酸をできるだけ除去したヒト副甲状腺ホルモンペプチド (1-34) を全量に対し酒石酸の量が 1.8 ~ 2.5 重量% の範囲となるように酒石酸を含有させた水溶液に溶解し、得られた溶液を凍結乾燥してなるヒト副甲状腺ホルモンペプチド (1-34) 安定化組成物。

2). ヒト副甲状腺ホルモンペプチド (1-34) 捕発性有機酸塩から存在していた捕発性有機酸をできるだけ除去したヒト副甲状腺ホルモンペプチド (1-34) を全量に対し酒石酸の量が 1.8 ~ 2.5 重量% の範囲となるように酒石酸を含有させた水溶液に溶解し、得られた溶液を凍結乾燥することを特徴とするヒト副甲状腺ホルモンペプチド

ド (1-34) 安定化組成物の製造法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明は、ヒト副甲状腺ホルモン (以下 h-PTH と称することがある) 活性を有する新規なヒト副甲状腺ホルモンペプチド (1-34) (以下、h-PTH (1-34) と称する) 安定化組成物およびその製造法に関する。

## 〔従来の技術〕

h-PTH (1-34) は、式  

$$\text{H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Ala-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Ala-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Ala-Val-His-Ala-Phen-OH}$$

で示され、ペプチド固相法により合成され、カラムクロマトグラフィーにより分離精製される段階で、ゲル沈過により脱塩する場合、Q/M酢酸で

溶出され、凍結乾燥により精製品が得られることは公知である〔H. P. P. - S. y. l. e. r. & Z. P. h. y. s. i. o. l. C. h. e. m., V. o. l. 35 5, 415~421, April 1974〕。

## 〔発明が解決しようとする問題点〕

上記の公知の方法により製造されるh-P.T.H. (/-34)は、精製の段階でゲル汎過により脱脂する場合、0.1M酢酸で平衡化したゲル汎過剤にチャージされ、0.1M酢酸で溶出されるため、少なくとも酢酸塩が形成された形で精製品として採取される。

しかしながら、この精製品の酢酸含量は製造ロットにより大きく変化して一定の酢酸含量を有する製品を得ることは困難であり、しかも65℃で3週間の放置でh-P.T.H.活性が約30%も低下するという欠点があつた。

上記の精製の段階で酢酸の代りに他の揮発性有機酸、例えば醋酸で溶出して得られる精製品も前記酢酸塩と同様の欠点を有することを知つた。

## 〔問題を解決するための手段〕

意味し、理論的にはh-P.T.H. (/-34) /セルに対しノーマルの範囲の揮発性有機酸を有し得る。上記揮発性有機酸塩中には、酸付加塩を形成するための揮発性有機酸以外に、凍結乾燥によつて除去されない揮発性有機酸も混入し得るので、酸付加塩の形成に関与しない揮発性有機酸の混入した酸付加塩も本発明のh-P.T.H. (/-34) 挥発性有機酸塩に包含される。また、h-P.T.H. (/-34)を精製する段階で、2種以上の揮発性有機酸で溶出を繰り返した場合には、得られる精製品は2種以上の揮発性有機酸塩を形成し得るので、この混合酸付加塩も本発明のh-P.T.H. (/-34) 挥発性有機酸塩に包含される。

本発明で定義した、存在していた揮発性有機酸をできるだけ除去したh-P.T.H. (/-34)とは、前記揮発性有機酸塩を陰イオン交換樹脂で処理して揮発性有機酸をできるだけ除去したh-P.T.H. (/-34)を意味するが、揮発性有機酸含量測定の信頼限界以上から約5重量%程度まで揮発性有機酸が含まれていてもよい。

そこで、本発明者らは、上記の問題を解決すべく種々研究を続けた結果、上記のh-P.T.H. (/-34)精製品を陰イオン交換樹脂で処理して、酢酸塩を形成することにより存在していた酢酸をできるだけ除去し、次いで一定の酒石酸量を含む水溶液に溶解して凍結乾燥すると、得られた凍結乾燥品は製造ロットに關係なく一定の酒石酸含量を有するだけでなく、従来の精製品より65℃での安定性がより優れていることを見出し、本発明を完成したものである。

即ち、本発明は、h-P.T.H. (/-34)揮発性有機酸塩から存在していた揮発性有機酸をできるだけ除去したh-P.T.H. (/-34)を全量に対し酒石酸の量が1.5~2.5重量%の範囲となるように酒石酸を含有させた水溶液に溶解し、得られた溶液を凍結乾燥してなるh-P.T.H. (/-34)安定化組成物およびその製造法である。

本発明で定義したh-P.T.H. (/-34)揮発性有機酸塩とは、h-P.T.H. (/-34)と揮発性有機酸、例えば酢酸、醋酸などとの酸付加塩を

上記の陰イオン交換樹脂としては、Dowex W.G.R.が適ましいが、これに限定されることはなく、他の公知の陰イオン交換樹脂も使用できる。

上記の陰イオン交換樹脂による処理は、h-P.T.H. (/-34)揮発性有機酸塩をできるだけ少量の水に溶解した溶液をOH<sup>-</sup>型の陰イオン交換樹脂のカラムにチャージし、水で溶出することにより行われる。各フラクションのh-P.T.H. (/-34)は、280nmにおけるUV吸収により確認し、h-P.T.H. (/-34)を含有するフラクションを凍結乾燥することにより、揮発性有機酸をできるだけ除去したh-P.T.H. (/-34)が得られる。

次に、揮発性有機酸をできるだけ除去したh-P.T.H. (/-34)から本発明のh-P.T.H. (/-34)安定化組成物を調製するのであるが、この調製は前記h-P.T.H. (/-34)を全量に対し酒石酸の量が1.5~2.5重量%の範囲となるように酒石酸を含有させた水溶液に溶解し、次いで得られた溶液を凍結乾燥することにより行われる。

上記調製の結果、b-PTH(／-34)は酒石酸との競合加塩を形成するが、理論的にはb-PTH(／-34)/モルに対し0.5~9モルの範囲の酒石酸を有し得る。しかしながら、競合加塩の形成に関与しない酒石酸が混入し得るので、酒石酸との競合加塩は勿論のこと、競合加塩の形成に関与しない酒石酸の混入した競合加塩も、本発明のb-PTH(／-34)安定化組成物に包含される。

## 〔発明の効果〕

このようにして得られたb-PTH(／-34)安定化組成物の熱安定性について述べる。

## (1) 試験方法

公知の方法により得られたb-PTH(／-34)酢酸塩および実施例1で得られた本発明のb-PTH(／-34)安定化組成物を各々約300μgを秤取し、サンプルチューブに入れ密栓した後、65°Cに放置し、0、1、2、3週間後に取り出し、各試料(ロ=2)を0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 2.0)溶液で500μg/mlの濃度となる

よう溶解し、このサンプルを次の条件による高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により残存するb-PTH(／-34)量を求めた。

## &lt;HPLC条件&gt;

HPLC装置:島津LC-4A  
カラム:4mm i.d.×150mm, Nucleosil C<sub>18</sub>

移動相:0.1% TFA-アセトニトリル(アセトニトリルを20分間に20→40%に変化させるグラジェント法)

流速:1ml/分

検出:UV 280nm

試料:500μg/mlの溶液25μl

## (2) 測定結果

0週のピーク面積を100%として各々の試料の残存活性の平均値を求めた結果は第1表の通りである。

第1表

|      | 残存活性(%) |      |      |      |
|------|---------|------|------|------|
|      | 0週      | 1週   | 2週   | 3週   |
| 公品   | 100     | 87.6 | 78.2 | 72.6 |
| 本発明品 | 100     | 90.0 | 86.3 | 85.1 |

以上の結果から、本発明のb-PTH(／-34)安定化組成物は、公知のb-PTH(／-34)酢酸塩より65°Cでの熱安定性がより優れていることを示すものである。

## 〔実施例〕

次に、参考例および実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

尚、製品中の酢酸および酒石酸含量の測定は、次の条件によるHPLCにより行つた。

## &lt;HPLC条件&gt;

HPLC装置: L-5000 HITACHI  
HPLC

カラム: Ultrosil PS-80H 8mm  
i.d.×300

移動相: 水(pH 2.0, HCl 2.0, による)

流速: 1.0ml/分

検出: UV 210nm

試料: 5mg/mlの溶液30μl

参考例

公知の方法で得たb-PTH(／-34)酢酸塩20mgをできるだけ少量の水に溶解し、水で平衡化したDowex WGR(OH<sup>-</sup>型)のカラム(2.5×10cm)にチャージし、水で溶出した。各フラクションをUV 280nmで確認し、b-PTH(／-34)を含むフラクションを集めて凍結乾燥してb-PTH(／-34)の凍結乾燥品を得た。

上記の操作を5回行つたが、b-PTH(／-34)の収率は86.0~94.0%であつた。

原料のb-PTH(／-34)酢酸塩および得られたb-PTH(／-34)凍結乾燥品の酢酸含量を測定すると、第2表の通りであつた。

第2表

| 原料(酢酸塩) | 酢酸含量  |
|---------|-------|
|         | 29.7% |